日本 ALS 協会

平成 23 年度「ALS 基金」研究奨励金

研究成果報告書

タイトル

体系的・網羅的遺伝子解析による ALS 関連遺伝子の探索

英文タイトル

Comprehensive and systematic analysis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related genes

氏　名

飯　田　有　俊

所属機関

独立行政法人　理化学研究所　ゲノム医科学研究センター

骨関節疾患研究チーム

上級研究員

目次

	頁
I. はじめに	
I-1. 家族性 ALS	3
I-2. 孤発性 ALS	4
II. ALS における Optineurin 遺伝子欠失機構	
II-1. 背景	5
II-2. 方法	7
II-3. 結果	8
II-4. 考察	10
II-5. 図　凡例	13
III. ZNF512B 結合タンパクの検索	
III-1. 背景	15
III-2. 方法	16
III-3. 結果	17
III-4. 考察	18
III-5. 図　凡例	19
IV. 引用文献	21
V. 謝辞	25
VI. 成果発表 (2011-2012 年)	25
VII. 図版	27

I. はじめに

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は、大脳皮質運動野の(上位)運動神経細胞と脳幹、脊髄の(下位)運動神経細胞が選択的かつ進行的に変性・脱落する原因不明の神経変性疾患である。2-3 年の経過で四肢や顔面、舌などの筋肉の萎縮と筋力低下が進行する。目下の所、有効な治療法がない。発症率と有病率は人口 10 万人あたり、それぞれ 0.3-2.4 人、および、5-6 人であり（Cronin et al. 2007)、本邦の患者数は約 8,000 人と推定されている。双生児研究より ALS の遺伝率は 0.61 と報告されている（Al-Chalabi et al. 2010)。

I-1. 家族性 ALS

ALS には、遺伝性の ALS（家族性 ALS)と孤発性の ALS が存在する。ALS のうち、約 10%が家族性 ALS である（Pasinelli and Brown. 2006)。近年の分子遺伝学の進歩により、家族性 ALS の発症に関わる 11 種類の遺伝子が単離されている。それらは、*SOD1* を始め、*NEFH*、*ALS2*、*DCTN1*、*VAPB*、*SETX*、*ANG*、*FUS*、*TARDBP*、*DAO*、*UBQLN2* などである(Andersen and Al-Chalabi. 2011; Mitchell et al. 2010; Deng et al. 2011)。しかしながら、それらの遺伝子変異頻度は、非常に低く、遺伝子変異は一部の患者、あるいは特定の地域の ALS 家系だけに認められる（Beleza-Meireles and Al-Chalabi. 2009)。

最近、本邦においても、ALS 家系の解析から *OPTN* が新規の ALS 原因遺伝子として同定された。*OPTN* の点変異は、家族性 ALS のみならず、孤発性 ALS の患者にも認められている(Maruyama et al. 2010)。

また一方、欧米での連鎖解析とポジショナルクローニングから *C9ORF72* が ALS と前頭側頭型認知症（FTD）の原因遺伝子として同定された。イントロン 1 に存在する 6 塩基（GGGGCC

リピート)が ALS/FTD 患者において異常伸長する（Renton et al. 2011; DeJesus-Hemandez et al. 2011)。つまり、対照では 23 回の繰り返しが、ALS では 700-1600 回に伸長し、実に欧州の家族性 ALS の 40%で異常伸長が認められるといわれる。欧米のゲノムワイド関連解析(Genome wide association study: GWAS)でも *C9ORF72* 領域は、また、ALS 重要領域のひとつとして報告されている（van Es et al. 2009)。但し、現時点で、本邦の ALS 症例における C9ORF72-GGGGCC リピートの異常伸長の報告はない。

I-2. 孤発性 ALS

ALS は、殆どが孤発性である。孤発性 ALS は、遺伝因子と環境因子が相互に関連し合って発症すると考えられていることから、単一遺伝病のような強い遺伝子変異が生じているというよりは、むしろ ALS 易罹患性遺伝子の遺伝子多型が ALS の成りやすさを規定していると推測されている（Schymick et al. 2007b)。

孤発性 ALS の疾患遺伝子研究は、候補遺伝子アプローチと GWAS が行われてきた。どちらも一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP)を基にした解析である。

候補遺伝子アプローチでは、現在まで *APEX*、*ANG*、*CHMP2B*、*NEFH* 、Paraoxonase 遺伝子群、*VEGF* が解析され、主に国外で 30 遺伝子以上の関連が報告されている（一部コピー数多型の報告もある）（Schymick et al. 2007b)。*NEFH*、*APEX*、*ANG* 遺伝子領域と ALS 発症との関連は、欧米人の集団において追試が成功している。しかしながら、その他の遺伝子と ALS との関連は、未だ明確な決着がついていないものが多い。最近の例でいえば、クロモグラニン B 遺伝子上の SNP（p.P413L)と ALS の関連が、フランス人、フランスーカナダ人種、スカンジナビア人種において報告されている(Gros-Louis et al. 2009)。しかし、ドイツ人種と他のフランス人集団を用いた解析では、その関連は認められていない（van Vught et al.

2010)。

ALS の GWAS 解析に関しては、近年、欧米のグループを中心にして盛んに行われてきた。現在までに、5 つの ALS 易罹患性遺伝子（*FGGY*、*ITPR2*、*DPP6*、*KIFAP3*、*UNC13A* の遺伝子領域内、もしくは近傍の領域）と関連領域 2 ヶ所（9p21.2 と 10q26.3 領域）が同定されている (Dunckley et al. 2007; Schymick et al. 2007a; Landers et al. 2009; Shatunov et al. 2010; van Es et al. 2007; van Es et al. 2008; van Es et al. 2009)。最近の報告によれば、先に示した *C9ORF72*-GGGGCC リピートの異常伸長と孤発性 ALS との関連が、イタリア人孤発性 ALS 集団でも確認された (Sabatelli M et al. 2012)。しかしながら、他方、これまでの GWAS の結果は、必ずしも全ての解析（人種）で追試が成功しているわけではなく、症例数を拡大した更なる解析が必要である (Chiò et al. 2009; Fernandez-Santiago et al. 2009; Daoud et al. 2010; Fogh et al. 2011; Iida et al. 2011a)。

本研究では、ALS 発症の分子機構を解明するために、これまで様々な分子遺伝学的法を用いて研究を行ってきた。今回、本報告書においては、(1) *OPTN* について新規変異機構を見出しこと、並びに(2)先のゲノム解析で発見した ZNF512B に結合するタンパク質の同定について、解析状況を報告する。

II. ALS における Optineurin 遺伝子欠失機構

II-1. 背景

OPTN によってコードされる Optineurin (オプチニューリン)は、577 アミノ酸からなる多機能タンパクで、当初、アデノウィルス E3-14.7K に結合するタンパクとして見出された (Li et al. 1998)。その遺伝子は、16 ヶのエキソンから構成され、発現は脳、網膜、骨格筋などで高い。

アミノ酸の1次構造から、様々な機能ドメイン（ZIP モチーフ、ロイシンジッパードメイン、コイルド・コイルドメイン、C 末端ジンクフィンガードメイン）が予測され、実際 NF-kB の調節、小胞輸送、免疫反応、転写調節に関与する（Chalasani et al. 2009）。また、Optineurin はハンティントン病の原因タンパクであるハンティンチンやミオシンIV、RAB8、NEMO などのタンパクと結合する（Chalasani et al. 2009）。

一方、*OPTN*は、原発性開放性緑内障の原因遺伝子でもある。2002 年に 3 種類の突然変異（p.E50K、691_692insAG と p.R545Q）、及び、非同義塩基置換（p.M98K）が報告されていた（Rezaie et al. 2002）。しかし、Maruyama et al.（2010）は、ホモ接合体マッピングとそれに続くポジショナルクローニングから *OPTN* を新規 ALS 原因遺伝子として同定した。Maruyama et al.（2010）は、689 例の日本人 ALS（92 例の家族性 ALS、597例の孤発性 ALS を解析し、3 種類の *OPTN*変異を発見した。

ひとつ目の変異は、エキソン5のホモ接合性の欠失であり、近親婚家系由来の同胞から見つかった。二つ目は、別の近親婚家系においてホモ接合性のナンセンス変異（p.Q398X)であった。この変異は、孤発性ALS症例でも発見された。そして、最後の変異は、ヘテロ接合性のミスセンス変異(p.E478G)であった。Optineurin の機能解析の結果、変異型 Optineurin は、NF-kB 活性の抑制効果を制御できなくなる。加えて、ミスセンス変異型の Optineurin は、ALS 患者における脊髄運動神経の細胞質に凝集体として沈着する（Maruyama et al. 2010)。

我々もまた、独自で *OPTN*のシークエンス解析を行い、2種類のミスセンス変異（p.A93P と p.E478G）を同定した。p.E478G は、家族例と孤発例の 1 例ずつに見出し、p.A93P は、孤発例 1 例に発見した（Iida et al. 2012a)。Maruyama et al. と我々の報告から、*OPTN*の点変異頻度は、家族性 ALS で 3.8%、孤発性 ALS では 0.29%であった。

他の ALS 原因遺伝子、*SOD1* の変異頻度は日本人孤発性 ALS で 1.6%（Akimoto et al.

2011)、*TARDBP*の変異率は、家族性 ALS で 3.0%、孤発性 ALS で 0.29%である (Iida et al. 2012b)。結局、*OPTN*の変異頻度は、孤発性 ALS に関して、*SOD1* の 1/5 程度、*TARDBP*のそれとは、殆ど変らなかった。

我々は、一連の*OPTN*遺伝子研究から、その変異率が不完全な変異検索による過少評価であるかもしれないと考えた。何故なら、(1) Maruyama et al. (2010)が既に *OPTN*遺伝子領域においてホモ接合性の欠失を見出していること、(2) 今までの変異解析が、PCRーダイレクトシークエンス法だけで行われていることによる。PCRーダイレクトシークエンス法は、ヘテロ接合性の欠失を見落としやすい。それゆえ、今度は *OPTN*の各エキソンに TaqMan プローブを作製し、*OPTN* の欠失を詳細に解析した。その結果、*OPTN* に点変異のない 710 例の ALS 症例で新規の欠失と既知の欠失、合わせて 5 つの欠失を新たに同定した。

II-2. 方法

II-2-1. 検体

検体は、710 例の ALS 症例 (685 例が孤発性 ALS、25 例が家族性 ALS)を用いた。すべての検体は、バイオバンクジャパンプロジェクト (Nakamura, 2007)より供与された。また、これらの検体は、PCR-ダイレクトシークエンス解析により *OPTN*の点変異が同定されなかったものである。対照となる検体は、日本人一般集団から成る。尚、本研究は、全ての被験者からインフォームドコンセントを取得し、各研究機関の倫理委員会の承認を受け、生命倫理に関する指針に基づいて遂行している。

II-2-2. TaqMan 法による定量的 PCR

*OPTN*の 16 エキソンをカバーする 15 ヶの TaqMan プローブを作製した。設計には、Primer

Express software v2.0 (Applied Biosystems)を使用した。15 プローブのうち、13 プローブをそれぞれのエキソン内に設計した。ただし、TaqMan プローブ 1 は、エキソン 1 が GC リッチ領域のため、イントロン 1 に設計した。TaqMan プローブ 3/4 は、エキソン 3 と 4 が非常に近いため、エキソン 4 内に設計した。リファレンス遺伝子は、*RNase P* (Applied Biosystems)を用いた。*OPTN* のコピー数は、定量的 PCR 法により行った (Hosono et al. 2009)。全ての解析は、TaqMan Universal PCR Master Mix 試薬 (Applied Biosystems)を用いた。

II-2-3. *OPTN* 切断点の同定

患者切断点のゲノム配列を明らかにするために、PCR で目的とする領域を増幅した。アガロースゲル電気泳動で PCR アンプリコンの増幅を確認し、ダイレクトシークエンスを行った。シークエンサーは、3730xl DNA アナライザー (Applied Biosystems)を用いた。患者切断点の DNA 配列は、標準配列と比較して決定した。反復配列は、RepeatMasker プログラム (www.repeatmasker.org/) により解析した。

II-3. 結果

OPTN のコピー数異常を検出するために、TaqMan アッセイを基盤とした定量的 PCR でスクリーニングした。その結果、710ALS 症例のうち、5 症例において、3 種類の欠失を発見した。ひとつ目は、既に Maruyama et al. (2010)によって報告されているホモ接合性の欠失であった。残りの 4 つは、新規の欠失で、ヘテロ接合性の欠失であった。欠失は、すべて孤発性 ALS に生じていた。

また、欠失は、470 例の日本人一般集団において全く認められなかった。全ての欠失の切断点は、Alu リピート配列内にあった。それゆえ、ALS 症例における *OPTN* の欠失は、

Alu-mediated recombination によって生じたものと推測された。3 種の欠失に関わる Alu リピート配列は、すべて異なるものであった。

II-3-1. 症例 304

症例 304 では、プローブ 5 が欠失していた（図 2-1左）。それに対して、プローブ 3/4 並びにプローブ6では欠失を認めなかった。結果、エキソン5を含む領域のホモ接合性欠失であった。欠失領域の切断点を同定する目的で、エキソン4とイントロン5に PCR プライマーを設計して解析した。対照では予想される 3.2 kb の PCR アンプリコンを得た。しかし、この症例では、1.4 kb のアンプリコンが検出された（図 2-2(a)）。PCR アンプリコンのダイレクトシークエンスを行い、欠失領域の切断点（Deletion 1）を同定した。結果、その切断点は、イントロン 4 とイントロン 5 の Alu リピート配列内に位置していた（図 2-3 上段)。この切断点は、以前、Maruyama et al. (2010)が報告したホモ接合性欠失と同一のものであった。Deletion 1 によって、premature stop codon が出現すると予想された。

II-3-2. 症例 256、454、460

症例 256、454、460 では、プローブ 3/4 及びプローブ 5 が欠失していた（図 2-1 下段右)。これらは、すべてヘテロ接合性の欠失であった。切断点を明らかにするために、イントロン 2 とイントロン 5 に PCR プライマーを設計して、PCR を行った。結果、対照では、4kb の PCR アンプリコンが増幅された。一方、患者では 4 kb の PCR アンプリコンに加え、650bpの PCR アンプリコンが検出された（図 2(b))。3 症例由来の PCR アンプリコンをダイレクトシークエンスした結果、切断点の配列は同一のものであった（図 2-3 下段、症例 460 のみ掲載している)。結局、欠失（Deletion 2)は、イントロン 2 とイントロン 5 内の Alu リピート領域内でが生じていることがわかった。翻訳開始点がエキソン4にあることから、これら 3 症例においては、*OPTN* の片方のアレルが null アレルになると予測できた。他方、一方のアレルには *OPTN* の変異はなか

った。

II-3-3. 症例 9

症例 9 では、プローブ1、2、およびプローブ 3/4 でヘテロ接合性の欠失を生じた（図 2-4 上段）。それに反して、プローブ 5 では欠失を認めなかった。この欠失の切断点を同定するために、エキソン 1 から上流 10 kb ごとにフォワードプライマーを設計し、エキソン 5 にはリバースプライマーを設計し、long PCR を行った。結果、*OPTN* の上流 92 kbに設計したプライマーとエキソン 5 に設計したプライマーを用いた long PCR において、7 kb の PCR アンプリコンを見出した（図 2-2 (c)）。切断点の配列を同定するために、患者由来の PCR アンプリコンのダイレクトシークエンスを行った。その結果、欠失（Deletion 3)は、*OPTN* の上流 85.8 kb の Alu リピート領域と *OPTN* のイントロン 4 内の Alu リピート領域で生じていることが判明した（図 2-4 下段）。もう一方のアレルには、変異は見つからなかった。

II-4 考察

本研究では、710 例の ALS について、*OPTN*のコピー数異常を調べた。その結果、5 例の孤発性 ALS において遺伝子欠失を同定した。Maruyama et al. (2010)との結果を合わせて考えると、エキソン 5 が *OPTN* の deletion hotspot であることが示唆された。今回、欠失が見つかった 5 例は、全て原発性開放角緑内障は合併していなかった。また、Maruyama et al. (2010)の報告によれば、*OPTN*の欠失は 200 例の日本人集団、さらには緑内障 6,800 例以上でも認められていない。我々の解析でも日本人一般集団 470 例で、欠失は認められなかった。それゆえ、今回発見した *OPTN* の欠失は、ALS 特異的な事象と考えられた。

これまで、Maruyama et al. (2010)は、*OPTN*の病態メカニズムを 2 つ提唱してきた。ひとつは、ホモ接合性欠失や、ホモ接合性ナンセンス変異から生ずる loss of function で、もうひとつは、

ヘテロ接合性ミスセンス変異による gain of function であった。

本研究において、Deletion 1 は、既知のホモ接合性の欠失を示した。*OPTN* の最終エキソンは、第 16 エキソンなので、Deletion 1 由来の変異 mRNA はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構（nonsense mediated RNA decay）により、null アレルになると考えられた（Bhuvanagiri, et al. 2010)。Deletion 2 と 3 についても、*OPTN* の翻訳開始点を含む領域の欠失であることから、同様に null アレルとなる。そして、ヘテロ接合性の欠失を認めた症例では、もう一方のアレルに変異はなかった。結局、ヘテロ接合性の欠失による病態発生メカニズムは、haploinsufficiency（ハプロ不全)であると考えられた。

Del Bo et al.（2011）は、イタリア人 ALS274 例について *OPTN* の変異検索を行い、ナンセンス変異（p.G23X）を含む 6 つの新規の変異を同定しているが、それらの変異も、すべて片側アレルの変異だった。

今回発見した5つの欠失は、すべて Alu リピート領域内で生じていた。従って、*OPTN* の欠失異常は、Alu mediated recombination によるものであった。

Alu リピートは、約 300 塩基の反復配列である。ヒトゲノムに散在し、全体の 10.6%を占めている（Lander et al. 2001)。解析の結果、*OPTN* 領域（38 kb）には、38 ヶ所の Alu リピート領域が存在していた。特にイントロン 2、4、5 が Alu リピート配列の高密度領域であった。高密度 Alu リピート領域と欠失領域が一致したことから、高密度 Alu リピート領域が *OPTN* 欠失の素因になっている可能性が示唆された。

Alu リピート配列間での組換えは、様々な疾患やがんにおいて報告されている（Deininger and Batzer. 1999)。Alu リピートは、進化上 3 種のサブファミリーに分類される（Batzer et al. 1996)。すなわち、older（Alu Jo, Jb,など)、intermediate（Alu Sc, Sx, Sq など)、younger（Alu Y, Ya, Yb など）である。Deletion 2 における組換えは、younger Alu Y で起こり、Deletion 1 と 3

では、Alu Jb と Alu Sx (Deletion 1)、Alu Y と Alu Jb (Deletion 3)間で組換えが生じていた。

我々は、*OPTN*の解析を通して、2 例の孤発性ALS において点変異を同定している。結局、今回の結果を合わせると、孤発性 ALS における *OPTN* の変異率は1%となり、この頻度は *TARDBP* の変異率よりも 3.5 倍ほど高かった。それゆえ、本邦の孤発性 ALS における *OPTN* の変異率は、*SOD1* に続くものであった。

以上の結果から、これまで知られている ALS の原因遺伝子で、変異率が低い理由は、本研究で発見したような染色体上の構造異常を見逃していた可能性がある。他の ALS 原因遺伝子についても構造異常検索を含めて包括的な解析を行う必要があるかもしれない。

II-5. 図　凡例

図 2-1. TaqMan qPCR による *OPTN* 欠失の検出

上段　*OPTN* のゲノム構造と TaqMan プローブの位置。下段　プローブ 5 を用いたときの *OPTN* 欠失の検出。左側　症例 304、ホモ接合性の欠失。右側　症例 454 と 460、ヘテロ接合性の欠失。縦軸　コピー数、横軸　検体番号。

図 2-2. ALS における *OPTN* の欠失

PCR 解析後のアガロースゲルイメージ。(a) 症例 304、患者において、1.4 kb の PCR アンプリコンを検出した。(b)症例 256、454、460、患者において、4 kb と 0.65 kb の PCR アンプリコンを検出した。(c)症例 9。*OPTN* 上流 86 kb の PCR プライマーとイントロン 4 のリバースプライマーで PCR をかけたときの結果。7 kb の PCR アンプリコンを検出した。M;DNA サイズマーカー。

図 2-3.　症例 304、460 における *OPTN* 切断点の同定

上段　症例 304、下段　症例 460。切断点の DNA 配列を示した。中段は、*OPTN* の遺伝子地図の一部を示した。イントロン 2 の中途からイントロン 6 の中途までを示した。Alu リピート領域の位置を示した。

図 2-4.　症例 9 における *OPTN* 切断点の同定

上段　*OPTN* の 5`上流のゲノム地図。TaqMan プローブ, CA マーカー、PCR プライマーを示した。欠失地図において、○は欠失なし、●欠失あり。各遺伝子は、矢印で示した。*RPL5P25*: リボソームタンパク L5 偽遺伝子 25. *CCDC3*: coiled-coil domain containing 3. 下段: 切断点の DNA 配列を示した。

図 2-5 （まとめ）ALS における *OPTN* 欠失

上段　*OPTN* 遺伝子上に我々の研究で発見した欠失領域と点変異の位置を示した。

III. ZNF512B 結合タンパクの検索

III-1. 背景

ALS 易罹患性遺伝子の単離を行うために、我々も独自の SNP プラットホーム（JSNP データベース由来の 52,608 SNPs）を用いて、大規模ゲノム関連解析を行った（Iida et al. 2011b)。ALS1,305 例と対照 4,244 例を解析した結果、ALS と有意な相関を示す rs2275294（T から C への塩基置換）を *ZNF512B* のイントロン 12 に発見した（P=9.3 X 10^{-10}、オッズ比 1.32（95%CI 1.21-1.44))。この SNP は、これまでの ALS-GWAS 研究で報告されていない新規のものであった。我々は、さらに rs2275294 を含む 111 kb に限局した ALS 重要領域の詳細な構造解析及び関連解析を行い、rs2275294 が、この領域内で唯一の ALS 易罹患性 SNP であることを確認した（図 3-1）。

ZNF512B は、元々かずさ DNA 研究所で行われていたヒト cDNA 単離プロジェクト（KIAA cDNA シリーズ）の一クローンとして登録されていたものであった（Nagase et al. 1999)。cDNA の全長は、5,919 bp で、893 アミノ酸をコードする。ゲノムサイズは、13kb で、17 エキソンから構成されている遺伝子である（図 3-2)。mRNA の発現は、脳、脊髄を含む多くの臓器で広く認められる。種々のプロテインデータベースの検索により、ZNF512B は C_2H_2 型のジンクフィンガードメインを持つ転写因子様タンパクと推測された。

rs2275294 が *ZNF512B* のイントロン 12 にあることから、先ずrs2275294 のアレル間でのエンハンサー活性の差異を調べた。その結果、rs2275294 は、*ZNF512B* プロモーターに対してエンハンサー活性を有すること、特に ALS リスクアレル C ではノンリスクアレル T に比べて転写活性能が低いことが分かった（図 3-3 (a))。このエンハンサー活性の減少は、ゲルシフトアッセイの解析から ALS リスクアレル C に対する未知の転写因子の結合能の低下によるものと

考えられた。

ZNF512B タンパクが神経の生存・保護に必須な TGF-βシグナルに関与することを示唆する報告があったので、TGF-βシグナルに対する ZNF512B の機能を TGF-β依存性 SMAD 特異的レポーターコンストラクトを用いて解析した（図 3-3 (b)）。神経芽細胞腫細胞株に ZNF512B を強制発現し、TGF-βで刺激したところ、SMAD 特異的レポーター活性が増強した。ZNF512B の siRNA では、この活性は減少した。更に、脊髄における ZNF512B の発現を免疫組織化学染色法で調べたところ、対照検体では発現は殆ど認められなかったのに対し、ALS 患者の運動ニューロンでは高発現していた。

以上の結果から、ZNF512B は TGF-βシグナルのポジティブレギュレーターで、rs2275294 のリスクアレルを持つ患者では、*ZNF512B* の発現量が低下し、ALS への易罹患性が高まると考えられた（図 3-3 (c)）。

そこで、本研究では、ALS 病態経路をさらに詳細に解明するために ZNF512B 結合タンパクの検索を行った。結果、ZNF512B が ZB1（暫定的に名づけた）と結合することがわかった。

III-2. 方法

III-2-1. 細胞培養

Cos7、SK_N_AS 細胞は、10%牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium の培地を用いて 37 C、5% CO_2 に設定した細胞培養用インキュベーターで培養した。

III-2-2. 発現コンストラクトの作製

ZNF512BcDNA を鋳型として、発現コンストラクト用のインサートを合成し、アダプターを制限酵素で切断後、pCDNA3.1A/myc-His ベクターにライゲーションした。ZNF512B 結合候補タ

ンパク ZB1 についても、cDNA を鋳型として、インサートを合成した。制限酵素で切断後、pCMV-HA ベクターにライゲーションした。得られたそれぞれのクローンの DNA 配列は、シークエンス解析によって確認した。

III-2-3. トランスフェクション（遺伝子導入）

遺伝子導入は、TransIT 試薬 （タカラバイオ株式会社）を用いて行った。DNA 濃度、TransIT 試薬の量は、TransIT 試薬取扱説明書に準じた。細胞は遺伝子導入後、24 時間-48 時間培養し、各実験に用いた。

III-2-4. 細胞内局在

チャンバースライドで細胞培養を行い、ZNF512B 発現プラスミドを導入した。4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X100 溶液で 2 分間処理した。ブロッキング液に浸した後、1 次抗体、次に 2 次抗体を反応させた。核染色用に DAPI を用いた。蛍光顕微鏡で観察した。

III-2-5. 免疫沈降法

ZNF512B-myc と ZB1-HA 発現クローン、negative control を Cos7 に同時に導入し、培養した。24 時間後、細胞を lysis buffer （(20mM Tris pH 7.5, with 150mM NaCl, 0.1% Nonident P-40)で溶解した。それぞれ抗体付アガロースビーズに結合させ、洗浄後、ウエスタンブロッティングにより結合を確認した。検出には、それぞれ、myc 抗体と HA 抗体を用いた。

III-3. 結果

III-3-1. ZNF512B の細胞内局在

結合タンパク実験を開始するにあたって、先ず ZNF512B の細胞内局在を解析した。その結果、ZNF512B は、核に局在することがわかった（図 3-4）。さらに、細胞の分画を核、細胞質に分けてウエスタンブロットを行ったところ、ZNF512B は核分画に検出された（data not shown）。

III-3-2. 候補タンパクの結合

ZNF512B 結合候補タンパクをタンパクの機能、局在、さらにはデータベースや文献検索により、18 種のタンパクに絞り込み、順次解析を行っている。本報告書では、その中のひとつ、ZB1 について報告する。実験は免疫沈降法により行った。ZNF512B-myc と ZB1-HA 発現クローンを Cos7 に同時に導入して、24 時間培養した。その後、免疫沈降法により、両タンパクの結合を確認した（図 3-5）。

III-4. 考察

ZNF512B の結合タンパクを同定するために、候補遺伝子アプローチ法、免疫沈降法を用いて解析を行った。その結果、現在までに ZB1 を同定した。ZB1 もまた転写因子のひとつであり、核の中で ZNF512B と協調的に働くことが示唆された。さらに、今回までの結果では、ZNF512B は、ZB1 と結合することにより、安定化することが示唆された。現在、内在性の ZNF512B と ZB1 の結合を確認している。さらに、現在、ゲノム解析の規模を 10 倍に拡大した GWAS も進行中である。これらのデータを包括的に解析することにより、ALS 病態カスケードを明らかにする。

III-5. 図　凡例

図 3-1. ALS 大規模関連解析から *ZNF512B* の同定

52,608 SNPs を用いた大規模関連解析により、ALS と有意な関連を認める SNP rs2275294 を発見した。この SNP は、第 20 番染色体 q13.3 領域に位置する *ZNF512B* のイントロン 12 に存在した。下段に SNP 地図と遺伝子地図を示した。rs2275294 と強い連鎖不平衡を示す SNP は存在しない。

図 3-2. *ZNF512B* のゲノム構造とタンパク構造

上段に *ZNF512B* のゲノム構造を示した。*ZNF512B* は、ゲノムサイズ 13kb で、17 ヶのエキソンから構成される遺伝子である。下段にタンパクの一次構造を示した。4 つの C_2H_2 ジンクフィンガードメインを有する。その構造から、転写因子として働くのではないかと推測されている。

図 3-3. TGF-βシグナル系における ZNF512B の機能

(a) SNP rs2275294 の C アレル領域を連結したコンストラクトでは、T アレルのコンストラクトに比して、エンハンサー活性が低下する。ルシフェラーゼアッセイの結果。Promoter: *ZNF512B* プロモーターのみのコンストラクト、Non-risk T: *ZNF512B* プロモーターに SNP rs2275294 の T アレル領域を連結したコンストラクト、Risk allele C は、*ZNF512B* プロモーターに SNP rs2275294 の C アレル領域を連結したコンストラクトを示した。(b) *ZNF512B* は、TGF-β依存性の転写活性を上昇させる。レポーターコンストラクトは、SBE4 (4 X Smad-binding element)を使用した。神経芽細胞腫細胞株に ZNF512B を強制発現させ、TGF-βで刺激した。(c) ALS 易罹患性機構。TGF-β signaling は、神経生存の維持に必須なシグナル経路である。ZNF512B は、TGF-βシグナル経路の正の調節因子である。rs2275294 の C アレルではエン

ハンサー活性が低下する。結果、*ZNF512B* の転写効率が低下することによって、 神経保護作用が低下し、ALS の易罹患性が引き起こされる

図 3-4. ZNF512B の細胞内局在。核に局在する。

図 3-5. ZNF512B と ZB1 の結合。ZNF512B と ZB1 を Cos7 細胞に導入後、免疫沈降法により解析した。下段、ZNF512B は、ZB1 と結合することで安定化する。

IV. 引用文献

Akimoto C, Morita M, Atsuta N, Sobue G, Nakano I. High-Resolution Melting (HRM) Analysis of the Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Gene in Japanese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (SALS) Patients. Neurol Res Int, 165415, (2011).

Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijsdijk F. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 81:1324-1326, (2010).

Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol, 7:603-615, (2011).

Batzer MA, Deininger PL, Hellmann-Blumberg U, Jurka J, Labuda D, Rubin CM, Schmid CW, Zietkiewicz E, Zuckerkandl E. Standardized nomenclature for Alu repeats.J Mol Evol. 42:3-6, (1996).

Beleza-Meireles A, Al-Chalabi A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. Amyotroph Lateral Scler, 10:1-14, (2009).

Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik, AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. Biochem J, 430:365-377, (2010).

Chalasani ML, Swarup G, Balasubramanian D. Optineurin and its mutants: molecules associated with some forms of glaucoma. Ophthalmic Res, 42:176-184, (2009).

Chiò A, Schymick JC, Restagno G, Scholz SW, Lombardo F, Lai SL, Mora G, Fung HC, Britton A, Arepalli S. et al. A two-stage genome-wide association study of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet, 18:1524-1532, (2009).

Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. Neurology, 68:1002-1007, (2007).

Daoud H, Belzil V, Desjarlais A, Camu W, Dion PA, Rouleau GA. Analysis of the UNC13A gene as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol, 67:516-517, (2010).

Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. Mol Genet Metab, 67:183-193, (1999).

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.

Neuron, 72:245-56, (2011).

Del Bo R, Tiloca C, Pensato V, Corrado L, Ratti A, Ticozzi N, Corti S, Castellotti B, Mazzini L, Soraru G. et al. Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 82:1239-1243, (2011).

Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. Nature, 477:211-215, (2011).

Dunckley T, Huentelman MJ, Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Joshipura K, Halperin RF, Stamper C, Jensen KR. Letizia D. et al. Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med, 357:775-788, (2007).

Fernandez-Santiago R, Sharma M, Berg D, Illig T, Anneser J, Meyer T, Ludolph A and Gasser T. No evidence of association of FLJ10986 and ITPR2 with ALS in a large German cohort. Neurobiol Aging, 32:551e1-4, (2009).

Fogh I, D'Alfonso S, Gellera C, Ratti A, Cereda C, Penco S, Corrado L, Soraru G, Castellotti B, Tiloca C. et al. No association of DPP6 with amyotrophic lateral sclerosis in an Italian population. Neurobiol Aging, 32:966-967, (2011).

Gros-Louis F, Andersen PM, Dupre N, Urushitani M, Dion P, Souchon F, D'Amour M, Camu W, Meininger V, Bouchard JP, et al. Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 106:21777-21782, (2009).

Hosono, N, Kato M, Kiyotani K, Mushiroda T, Takata S, Sato H, Amitani H, Tsuchiya Y, Yamazaki K, Tsunoda T. et al. CYP2D6 genotyping for functional-gene dosage analysis by allele copy number detection. Clin Chem, 55:1546-1554, (2009).

Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S. et al. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. Neurobiol Aging, 32:757e13-4, (2011a).

Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K. et al. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. Hum Mol Genet, 20:3684-3692, (2011b).

Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, Ikegawa S. Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 83:233-235, (2012a).

Iida A, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Nakamura Y, Ikegawa S. Large-scale screening of TARDBP mutation in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. Neurobiol Aging, 33:786-790, (2012b).

Lander ES, Linton, LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409:860-921, (2001).

Landers JE, Melki J, Meininger V, Glass JD, van den Berg LH, van Es MA, Sapp PC, van Vught PW, McKenna-Yasek DM, Blauw HM. et al. Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 106:9004-9009, (2009).

Li Y, Kang J, Horwitz MS. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. Mol Cell Biol, 18:1601-1610, (1998).

Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H. et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature, 465:223-226, (2010).

Mitchell J, Paul P, Chen HJ, Morris A, Payling M, Falchi M, Habgood J, Panoutsou S, Winkler S, Tisato V, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. Proc Natl Acad Sci U S A, 107:7556-7561, (2010).

Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R, Hirosawa M, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res, 6:337-345, (1999).

Nakamura Y. The BioBank Japan Project. Clin Adv Hematol Oncol, 5:696-697, (2007).

Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat Rev Neurosci, 7:710-723, (2006).

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L,et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron, 72:257-268, (2011).

Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Heon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D. et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. Science, 295:1077-1079, (2002).

Sabatelli M, Conforti FL, Zollino M, Mora G, Monsurrò MR, Volanti P, Marinou K, Salvi F, Corbo M, Giannini F, et al. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions in the Italian sporadic ALS population. Neurobiol Aging, Epub ahead of print, (2012).

Schymick JC, Scholz SW, Fung HC, Britton A, Arepalli S, Gibbs JR, Lombardo F, Matarin M, Kasperaviciute D, Hernandez DG. et al. Genome-wide genotyping in amyotrophic lateral sclerosis and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. Lancet Neurol, 6:322-328, (2007a).

Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet, 16:R233-242, (2007b).

Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale ME, Smith B, Vance C, Johnson L, Veldink JH, van Es MA, van den Berg LH. et al. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study. Lancet Neurol, 9:986-994, (2010).

van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Andersen PM, Van Den Bosch L, de Jong SW, van 't Slot R, Birve A. et al. ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. Lancet Neurol, 6:869-877, (2007).

van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van den Bosch L, de Jong SW, de Jong V, Baas F, van't Slot R. et al. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet, 40:29-31, (2008).

van Es MA, Veldink JH, Saris CG, Blauw HM, van Vught PW, Birve A, Lemmens R, Schelhaas HJ, Groen EJ, Huisman MH. et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet, 41:1083-1087, (2009).

van Vught PW, Veldink JH, van den Berg LH. P413L CHGB is not associated with ALS susceptibility or age at onset in a Dutch population. Proc Natl Acad Sci U S A, 107:E77, (2010).

V. 謝辞

本研究にご支援いただきました日本 ALS 協会 長尾義明会長はじめ会員の皆様方、並びに関係各位の方々に深謝いたします。これからも頑張りますので、何卒よろしくお願い申し上げます。また、これまでの研究に際し、ご指導いただきました中村祐輔教授（東京大学医科学研究所）、池川志郎チームリーダー（理化学研究所ゲノム医科学研究センター）をはじめ、多くの先生方に深謝いたします。

VI. 成果発表（2011-2012 年）

学会発表

（1）**飯田有俊**、高橋篤、久保充明、亀井徹正、佐野元規、大嶋秀一、徳田虎雄、青木正志、梶龍兒、中野今治、辻省次、祖父江元、中村祐輔、池川志郎、（一般口演）、
大規模ゲノム関連解析を用いた 新規 ALS 感受性遺伝子の同定、第 52 回 日本神経学会学術大会、名古屋、日本、2011 年 5 月

⑵ **飯田有俊**、田中章景、中村祐輔、祖父江元、池川志郎、（一般口演とポスター発表）
新規 ALS 感受性遺伝子 ALSC1 は、TGF-βシグナルのポジティブレギュレーターである、第 84 回 日本生化学会大会、京都、日本、2011 年 9 月

分科班ワークショップ

⑴ **飯田有俊**、中村祐輔，池川志郎
大規模ゲノム関連解析による新規 ALS 易罹 患性遺伝子 ZNF512B の同定
厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業)「病態に根ざした ALS の新規

治療法開発班」平成 23 年度ワークショップ、東京、日本、2011 年 9 月

発表論文

Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. Neurobiology of Aging, *in press,* (2012)

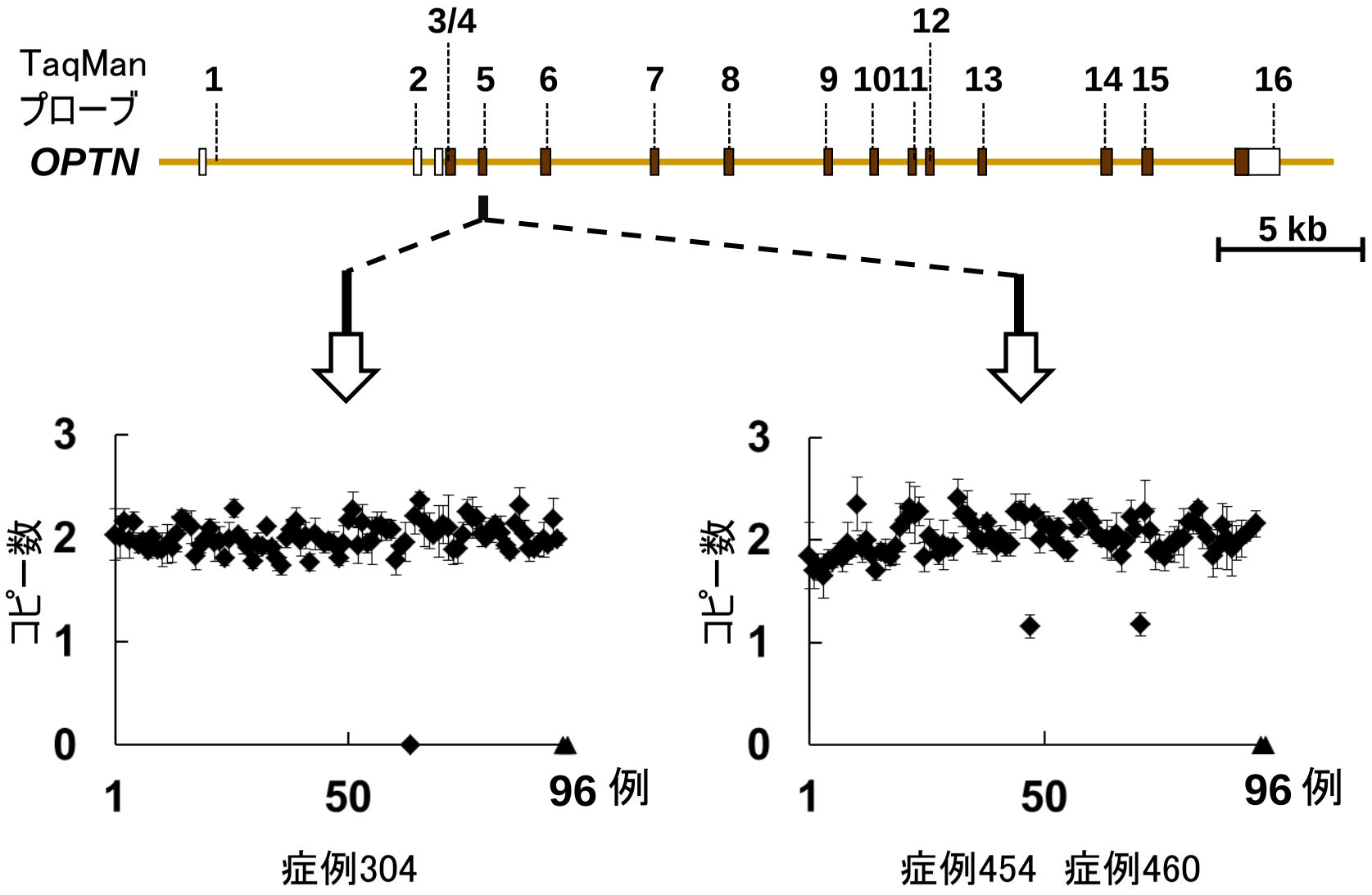


図2-1. TaqMan qPCRによる*OPTN*欠失の検出

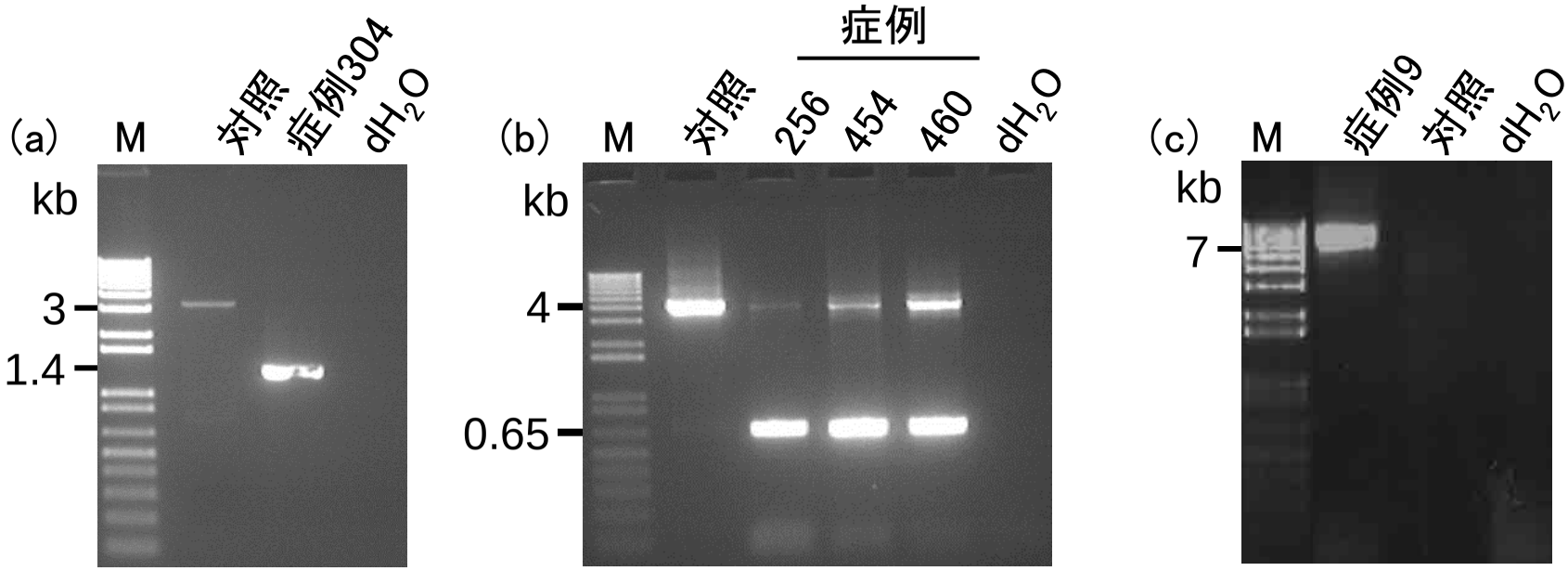


図2−2. ALSにおける*OPTN*の欠失

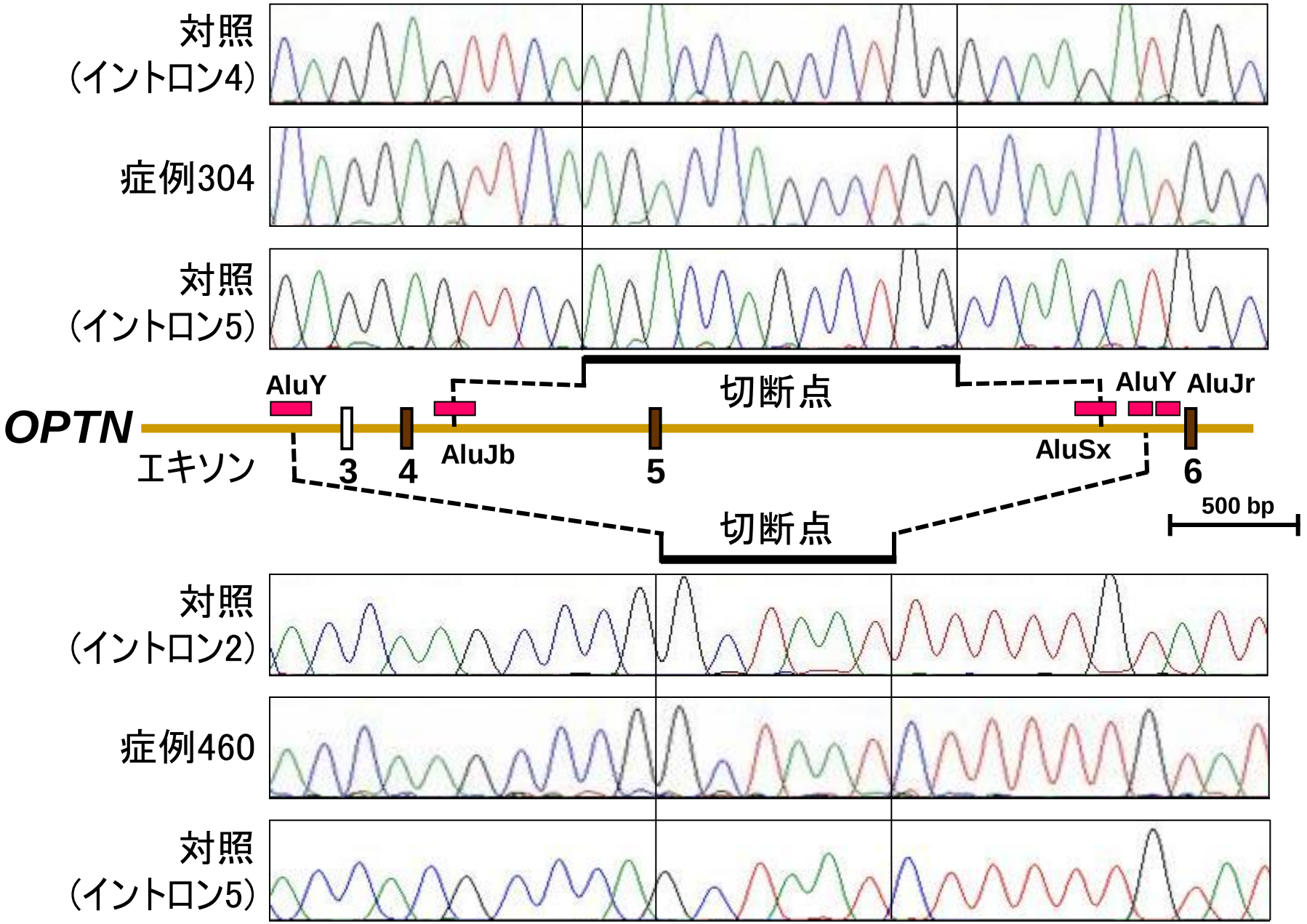


図2−3. 症例304、460における*OPTN*切断点の同定

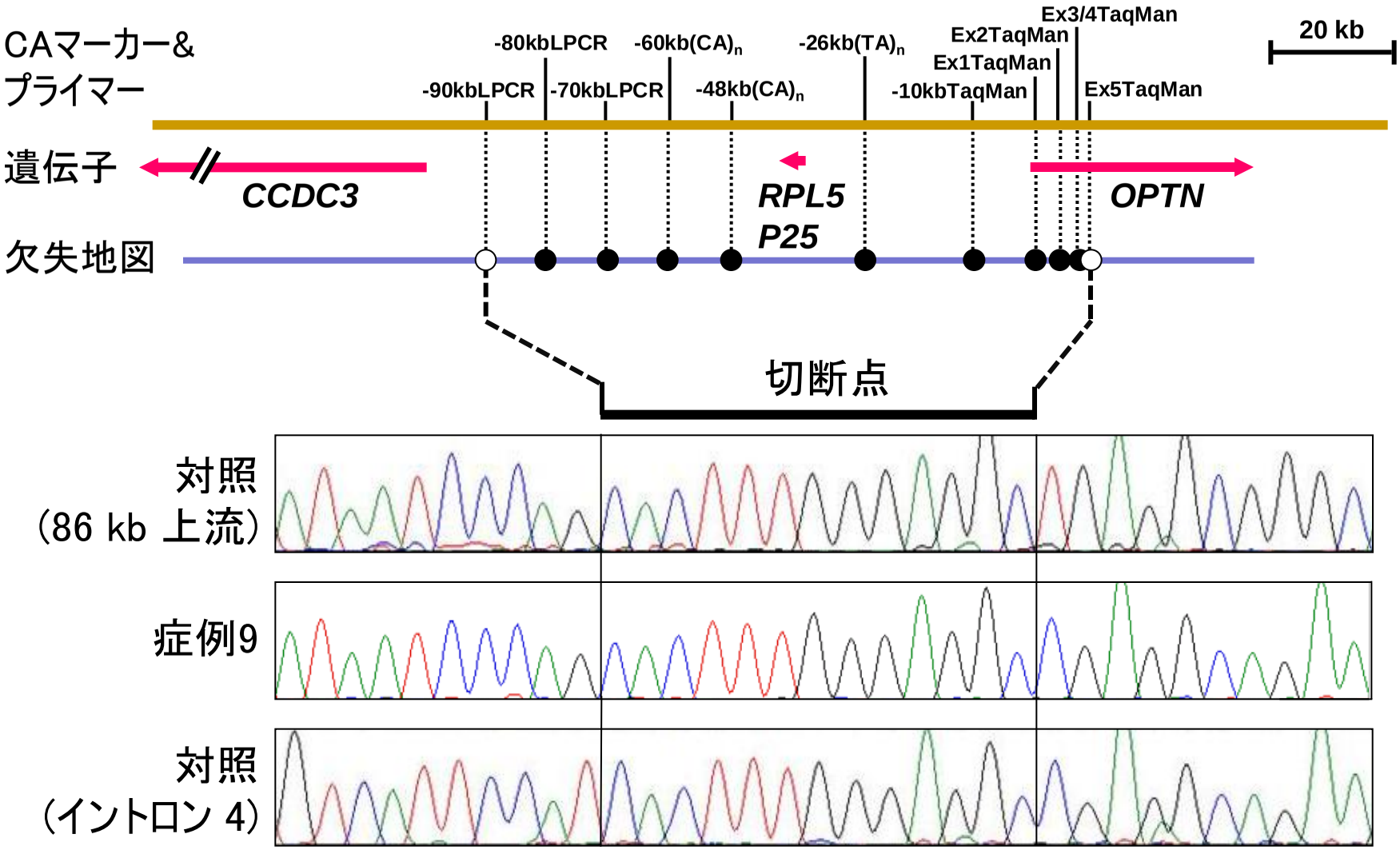
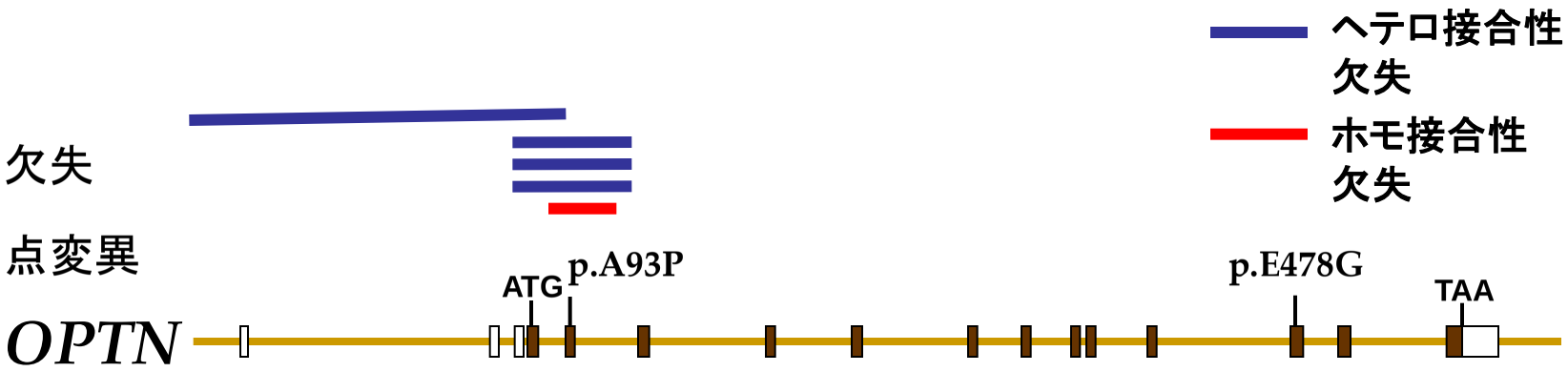


図2−4.　症例9における*OPTN*切断点の同定



- 710例中、5例のALSで*OPTN*内のdeletionを発見
- 1例のホモ接合性欠失と4例のヘテロ接合性欠失
- haploinsufficiencyによるALS発症機構
- エキソン5領域が欠失のホットスポット

図2-5. （まとめ） ALSにおける*OPTN*欠失

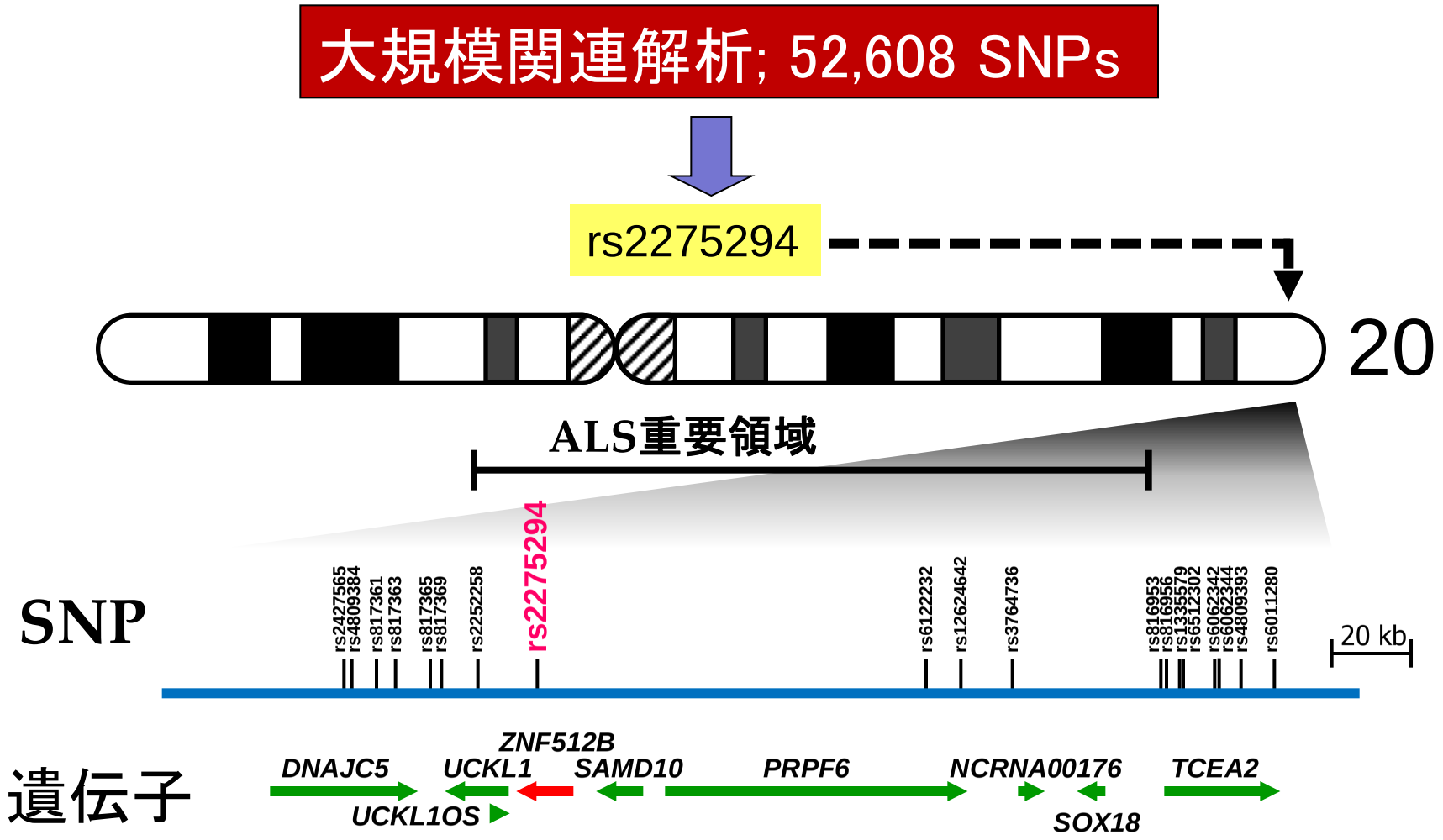
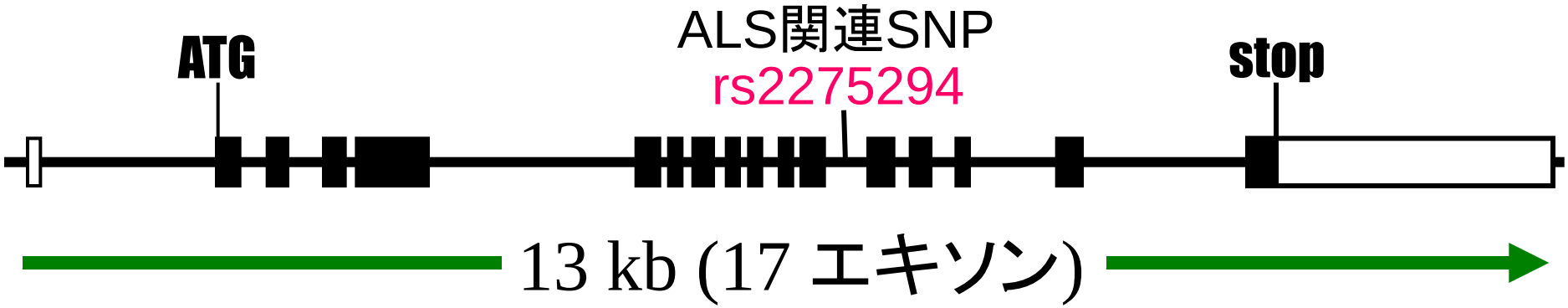
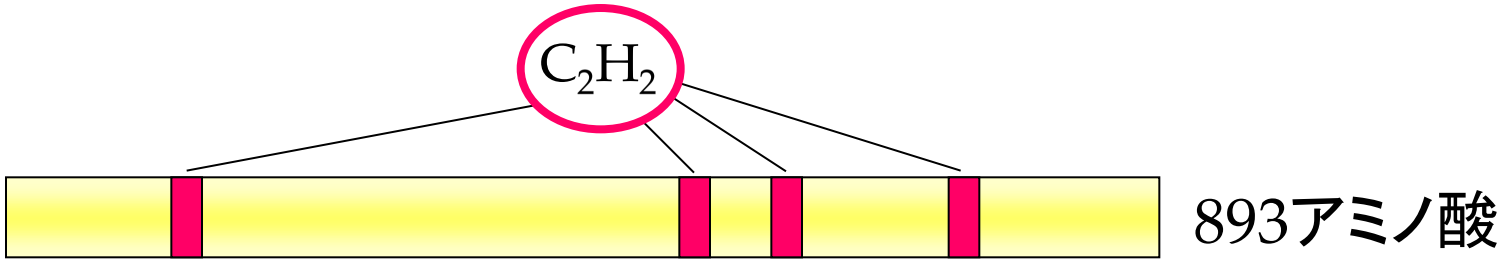


図3−1. ALS大規模関連解析から*ZNF512B*の同定

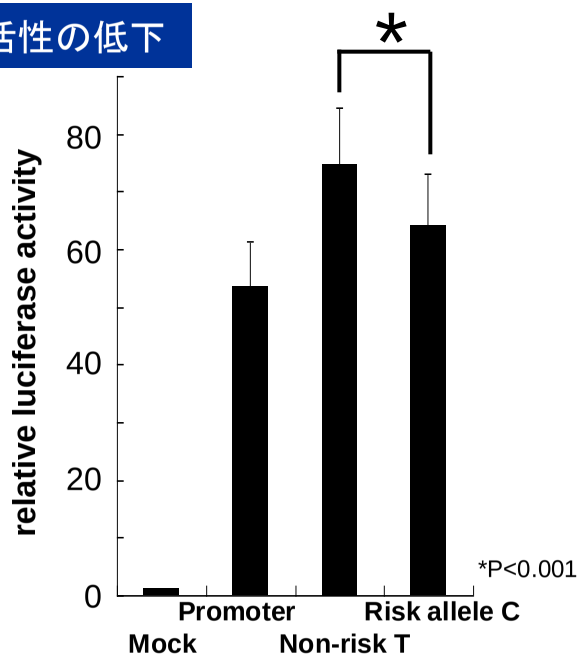




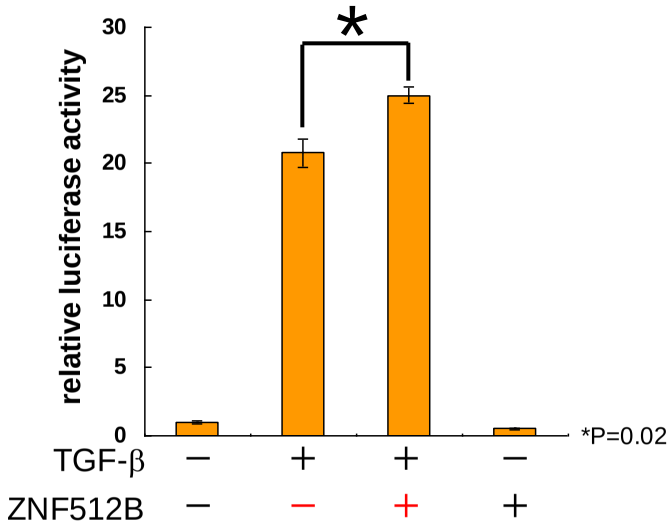
＊C_2H_2 ジンクフィンガードメイン
＊転写因子様構造

図3−2. *ZNF512B*のゲノム構造とタンパク構造

(a) エンハンサー活性の低下



(b) TGF-βポジティブレギュレーター



(c) ALS易罹患性機構

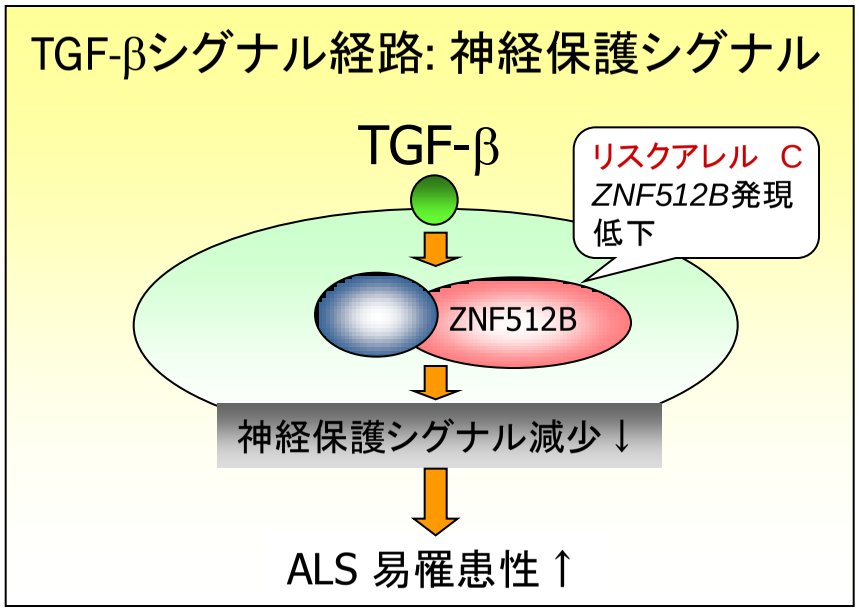
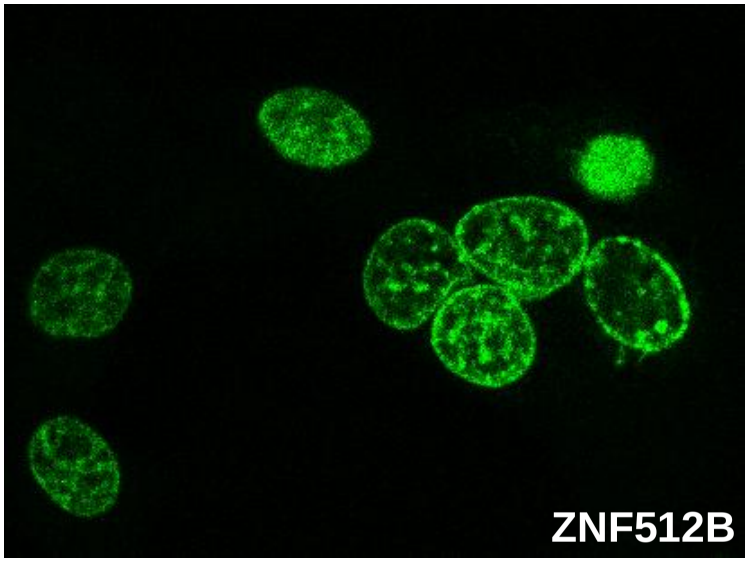
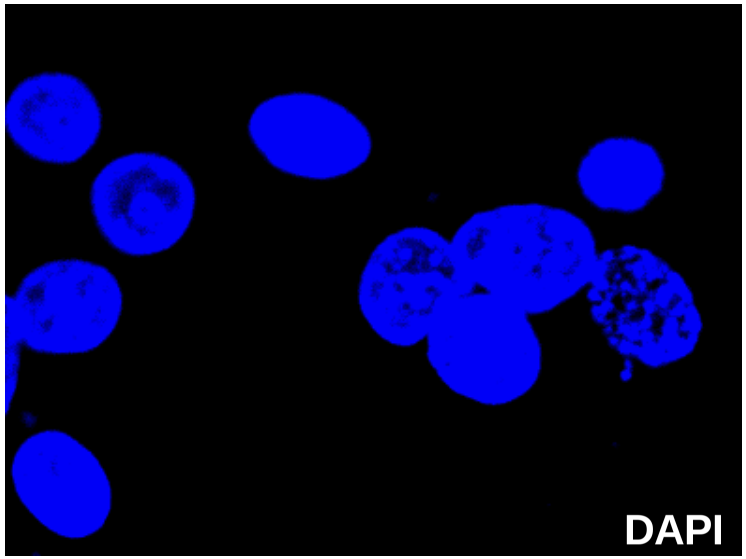


図3−3. TGF−βシグナル系における
ZNF512Bの機能





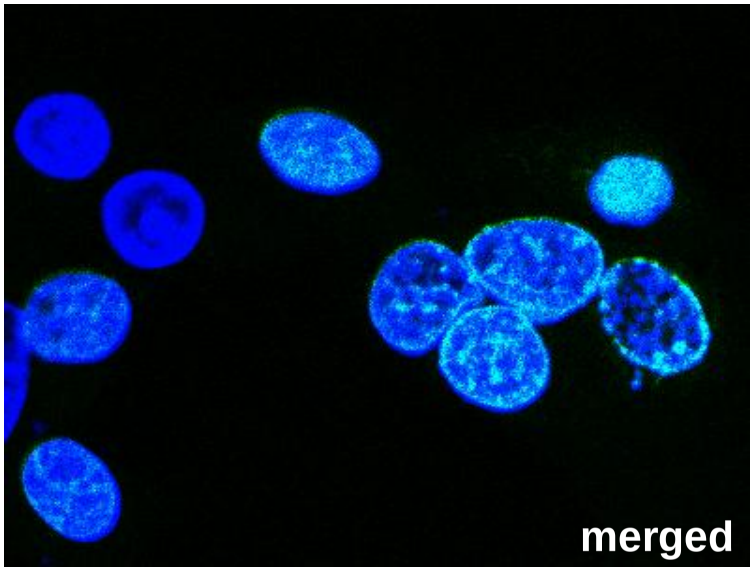


図3-4. ZNF512Bの細胞内局在

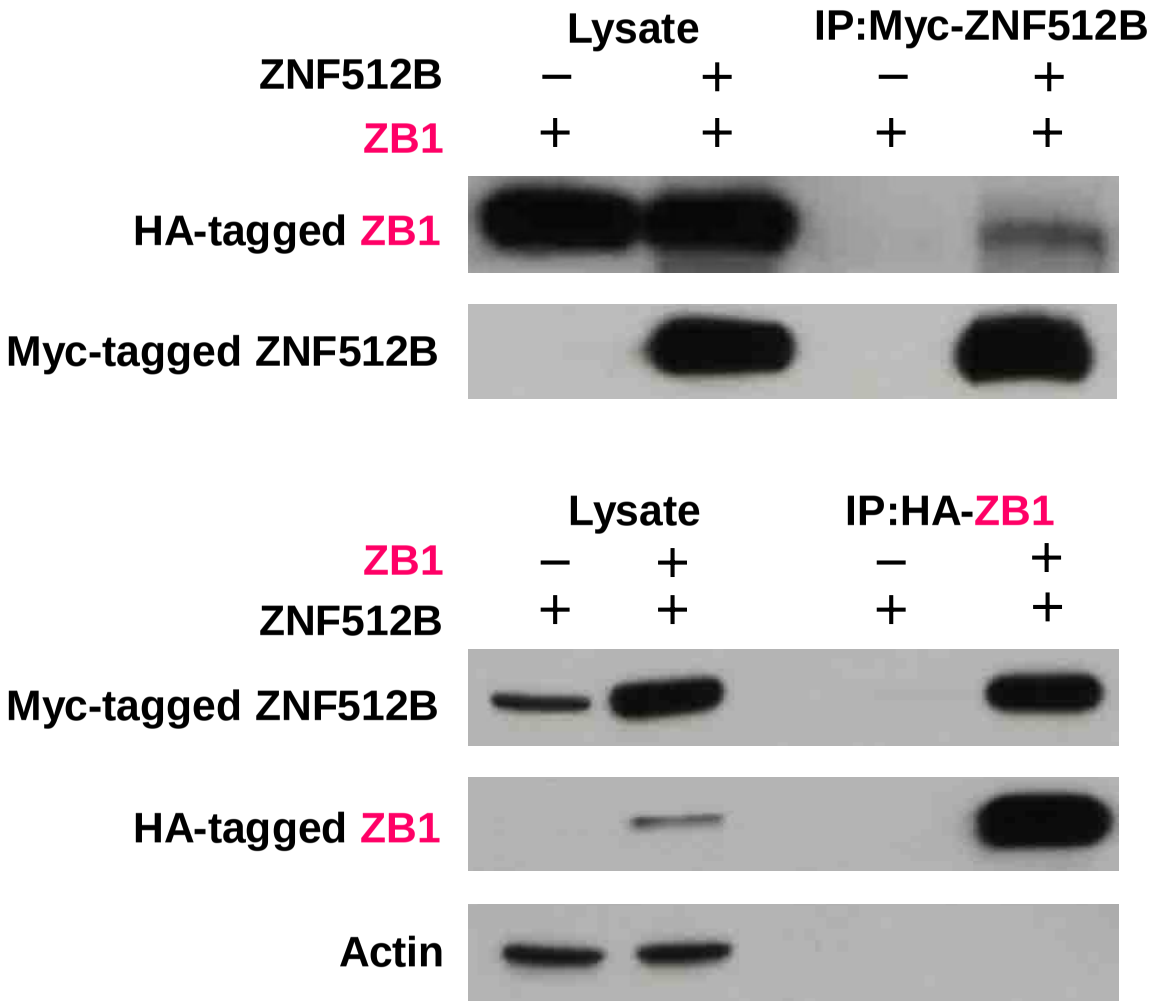


図3−5. ZNF512BとZB1の結合